

Inhibition of ubiquitin ligase F-box and WD repeat domain-containing 7 (Fbw7) causes hepatosteatosis through Kruppel-like factor 5 (KLF5)/Peroxisome proliferator-activated receptor 2 (PPAR 2) pathway but not SREBP-1c protein in mice

著者	熊懷 信
内容記述	Thesis (Ph. D. in Medical Sciences)--University of Tsukuba, (B), no. 2616, 2012.8.31 Offprint. Originally published in: Journal of biological chemistry, v. 286, no. 47, pp. 40835-40846, 2011 Includes supplementary treatises Includes bibliographical references (leaves [11-12])
発行年	2012
その他のタイトル	マウスにおけるFbw7 の抑制は、SREBP-1cタンパク質ではなくKLF5/PPAR 2経路を介し肝脂肪症を引き起こす
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2241/120480">http://hdl.handle.net/2241/120480</a>

氏 名 (本籍)	熊 <sup>くま</sup> 懷 <sup>だき</sup> 信 <sup>しん</sup> (東 京 都)
学 位 の 種 類	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	博 乙 第 2616 号
学位授与年月日	平成 24 年 8 月 31 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
審 査 研 究 科	人間総合科学研究科
学 位 論 文 題 目	<b>Inhibition of Ubiquitin Ligase F-box and WD Repeat Domain-containing 7<math>\alpha</math> (Fbw7<math>\alpha</math>) Causes Hepatosteatosi through Krüppel-like Factor 5 (KLF5) /Peroxisome Proliferator-activated Receptor <math>\gamma</math>2 (PPAR<math>\gamma</math>2) Pathway but Not SREBP-1c Protein in Mice.</b> (マウスにおける Fbw7 $\alpha$ の抑制は、SREBP-1c タンパク質ではなく KLF5/PPAR $\gamma$ 2 経路を介し肝脂肪症を引き起こす)
主 査	筑波大学教授 医学博士 正 田 純 一
副 査	筑波大学准教授 博士 (薬学) 長谷川 潤
副 査	筑波大学講師 博士 (医学) 松 井 裕 史
副 査	筑波大学助教 博士 (医学) 西 村 健

## 論 文 の 内 容 の 要 旨

### (目的)

F-box and WD repeat domain-containing 7 $\alpha$  (Fbw7 $\alpha$ ) は、標的タンパク質をポリユビキチン化し、プロテオソームによる分解を誘導するユビキチンリガーゼ複合体の構成因子である。Fbw7 $\alpha$  は脂質合成を制御する転写因子である sterol regulatory element-binding protein (SREBP) 1a の核型タンパク質の分解も誘導することが報告されていることより Fbw7 $\alpha$  の脂質代謝への関与が注目される。本研究では、Fbw7 $\alpha$  が肝臓における脂質代謝にどのような役割を果たしているかを、*in vivo* モデルにおいて解明することを目的とした。

### (対象と方法)

Fbw7 $\alpha$  を遺伝子レベルでノックダウンするアデノウイルス (Fbw7i) と、過剰発現させるアデノウイルス (Ad-Fbw7 $\alpha$ ) を作製し、それぞれマウスの肝臓に感染させ、肝臓の重量や脂質含量の変化、脂質関連因子の発現変化を解析した。

次に、Peroxisome Proliferator-activated Receptor (PPAR)  $\gamma$ 2 を遺伝子レベルでノックダウンするアデノウイルス (PPAR $\gamma$ 2i) を作製し、マウスに Fbw7i と PPAR $\gamma$ 2i を同時に感染させ、肝臓の脂質含量の変化、脂質関連因子の発現変化を解析した。

さらに、PPAR $\gamma$ 2 の発現を制御している Krüppel-like Factor 5 (KLF5) と Fbw7 $\alpha$  を培養細胞に共発現させ、Fbw7 $\alpha$  による KLF5 タンパク質の分解について検討した。加えて、KLF5 を欠損させたマウス初代培養肝細胞へ Fbw7i を感染させ、PPAR $\gamma$ 2 の遺伝子発現変化を解析した。

### (結果)

Fbw7i により肝 Fbw7 $\alpha$  をノックダウンしたところ、肝中性脂肪 (TG) 含量は顕著に増大したが、Fbw7 $\alpha$  の標的とされる核型 SREBP-1 タンパク質量に変化は無く、脂質合成系および酸化系の遺伝子発現に目立つ

た変化は認められなかった。一方、肝 Fbw7 $\alpha$  ノックダウン時に PPAR $\gamma$ 2 とその下流因子の遺伝子発現亢進が認められた。また、Ad-Fbw7 $\alpha$  により、C57BL/6J マウスの肝 Fbw7 $\alpha$  を過剰発現したところ、核型 SREBP-1 タンパク質の分解誘導は認められず、PPAR $\gamma$ 2 とその下流因子の遺伝子発現低下が確認された。

次に、Fbw7i と PPAR $\gamma$ 2i によって、マウスの肝 Fbw7 $\alpha$  と肝 PPAR $\gamma$ 2 を同時にノックダウンしたところ、Fbw7 $\alpha$  のみのノックダウンによって誘導される PPAR $\gamma$ 2 下流因子の遺伝子発現亢進、および肝 TG 含量の増大が減弱した。また、培養細胞に KLF5 と Fbw7 $\alpha$  を共発現させた場合、Fbw7 $\alpha$  存在下で KLF5 の分解が促進された。KLF5 を欠損したマウス初代培養肝細胞では、Fbw7 $\alpha$  のノックダウンによる PPAR $\gamma$ 2 の遺伝子発現亢進が減弱した。

#### (考察)

*In vitro* 研究から、Fbw7 $\alpha$  が核型 SREBP-1 タンパク質の分解に寄与することが確認されているが、*in vivo* で Fbw7 $\alpha$  の発現を変化させた場合、核型 SREBP-1c タンパク質量に目立った変化は認められなかった。本研究において、Fbw7 $\alpha$  が、KLF5 タンパク質の分解を誘導し、PPAR $\gamma$ 2 とその下流の脂肪酸輸送や TG 合成に関与する因子の発現を抑制することにより、肝脂質代謝を制御していることが示唆された。

### 審 査 の 結 果 の 要 旨

本論文の要点は、Fbw7 $\alpha$  をノックダウンすることによって肝脂肪化が現れれば、その原因は核 SREBP-1a の分解抑制による恒常的な活性化が生じることで肝脂肪化が誘導されとの仮説より研究が開始されたと推測される。しかし、実際には、Fbw7 $\alpha$  をノックダウンにより肝 TG の蓄積が出現したものの、SREBP-1 のタンパク質量には変化が認められず、また、SREBP-1KO マウスで Fbw7 $\alpha$  をノックダウンしても、WT マウスでノックダウンした場合と大きな変化が認められなかった。

また、PPAR $\gamma$ 2 の発現を制御する KLF5 は、Fbw7 $\alpha$  の存在化で分解促進により発現が低下する。Fbw7 $\alpha$  をノックダウンすると KLF5 の分解が阻害され、その結果として PPAR $\gamma$ 2 の過剰発現が起こると推測された。このことは、Fbw7 $\alpha$  と同時に KLF5 をノックダウンすると、PPAR $\gamma$ 2 の Fbw7 $\alpha$  による過剰発現の誘導が消失することから確認された。すなわち、本論文において肝 TG 蓄積の原因には、Fbw7 $\alpha$  ノックダウンにより、KLF5 の分解の阻害による PPAR $\gamma$ 2 の発現増加、さらに CD36 の発現増加による脂肪酸の取り込み亢進が関与していると推測される。

本研究は、Fbw7 $\alpha$  の機能を解明するために、様々な遺伝子操作や遺伝子改変マウスを用いた実験がなされており評価に値する。

平成 24 年 6 月 25 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもと論文について説明を求め、関連事項について質疑応答を行い、学力の確認を行った。その結果、審査委員全員が合格と判定した。

よって、著者は博士（医学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。